

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-174724

(43) 公開日 平成6年(1994)6月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543		9217-2 J		
15/02	A	6928-2 J		
15/14	C	6928-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数9 (全 8 頁)

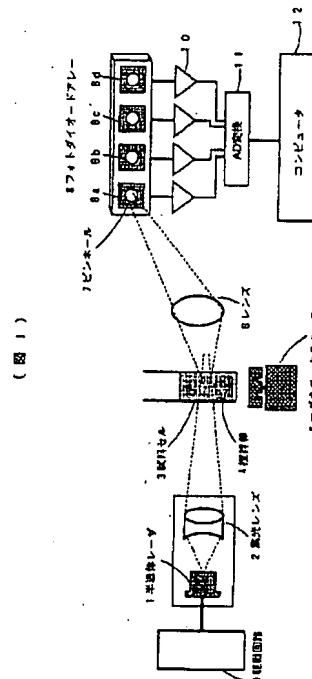
(21) 出願番号	特願平4-325032	(71) 出願人	000163006 興和株式会社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
(22) 出願日	平成4年(1992)12月4日	(72) 発明者	白澤 義▲章▼ 茨城県つくば市観音台1-25-5 興和株式会社興和総合科学研究所内
		(72) 発明者	山本 哲也 茨城県つくば市観音台1-25-5 興和株式会社興和総合科学研究所内
		(72) 発明者	石川 宗晴 茨城県つくば市観音台1-25-5 興和株式会社興和総合科学研究所内
		(74) 代理人	弁理士 加藤 卓

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定装置

(57) 【要約】

【目的】 凝集塊の大きさと数とを時系列で測定できる免疫学的凝集測定装置を提供する。

【構成】 散乱光強度測定のための半導体レーザ光源のレーザ光は、集光レンズ2によってコリメートされ、抗原および抗体を含む試料ガラスセル内の内壁近傍に照射される。試料溶液中の凝集塊からの散乱光は、受光レンズ6を介して複数の受光素子のフォトダイオード8 (8a~8d) によって電気信号として測定される。フォトダイオード8の出力は増幅器10により電流電圧変換、増幅後、AD変換器11によりAD変換されてコンピュータ12に入力され、凝集塊の粒径とその数を表示するためのデータ演算を行なう。



B7

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中に含まれる抗原もしくは抗体と特異的に反応する抗体もしくは抗原と、或いは、抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子を含む溶液を混合して抗原抗体凝集反応を生じさせることにより、生体試料中の諸成分の量を測定する免疫学的測定装置において、

レーザ光源と、

レーザ光源からのレーザ光束をコリメートして反応試料セルに照射する手段と、

反応試料セル中の抗原及び抗体を含む試料溶液を攪拌することにより、抗原抗体凝集反応を均一に発現させ、且つ、攪拌による流れにより凝集散乱体をレーザ光束中に通過させる手段と、

試料セル中の散乱体からの多重散乱光の受光を防ぐ目的で、レーザ光束を試料セル内壁近傍に通過させる手段と、

試料セルからの散乱光を受光する受光素子と、

受光素子からの信号を評価して抗原抗体反応による凝集塊の粒子径とその数を時系列的に計測する手段と、

計測された凝集塊の粒子径とその数を表示する手段とを備えたことを特徴とする免疫学的測定装置。

【請求項2】 前記計測手段が、凝集塊の粒子径に対応した上方しきい値と下方しきい値を有し受光素子からの信号を各しきい値と比較して凝集塊の粒子径を識別する複数の比較手段と、各比較手段からの信号を計測するカウンタからなり、比較手段の数に対応した凝集塊の粒子径とその数が時系列的に計測されることを特徴とする請求項1に記載の免疫学的測定装置。

【請求項3】 前記受光素子が測定粒子のほぼ1個からの散乱光を受光するように構成されることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の免疫学的測定装置。

【請求項4】 複数の受光素子が設けられ、その受光素子に対応した散乱光が同時に測定されることを特徴とする請求項1から請求項3までのいずれか1項に記載の免疫学的測定装置。

【請求項5】 前記受光素子からの一対からの出力を減算して有効信号の割合を増大させることを特徴とする請求項4に記載の免疫学的測定装置。

【請求項6】 前記計測手段は、式

【数1】

$$X_t = \sum_{k=2}^n (\omega_k P_k)$$

(ただし、Kは凝集数、 ω_k はk個の凝集塊に付加する重み係数、 P_k は凝集数kの粒子数、nは2以上の任意の整数)から時間t当たりの凝集塊粒子数 X_t を求めることを特徴とする請求項1から請求項5までのいずれか1項に記載の免疫学的測定装置。

【請求項7】 抗原もしくは抗体とを含む試料中にそれ

らと特異的に結合する抗体もしくは抗原、或いは、抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子を添加した時点から一定以上の凝集塊粒子数 X_t が計測されるまでの時間TL(遅延時間)を求め、TLと試料中の抗原もしくは抗体の量(濃度)との相関から目的の生体成分の濃度を求めることを特徴とする請求項1から請求項6までのいずれか1項に記載の免疫学的測定装置。

【請求項8】 抗原もしくは抗体とを含む試料中にそれらと特異的に結合する抗体もしくは抗原、或いは、抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子とを混合して生ずる凝集塊粒子の生成速度 $V(V = dX_t / dt)$ の最大値 V_{max} を求め、 V_{max} と試料中の抗原もしくは抗体の量(濃度)との相関から目的の生体成分の濃度を求めることを特徴とする請求項1から請求項7までのいずれか1項に記載の免疫学的測定装置。

【請求項9】 請求項1に記載の免疫学的測定装置において、抗原もしくは抗体とを含む試料中にそれらと特異的に結合する抗体もしくは抗原、或いは、抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子とを混合して生ずる凝集塊粒子の数 X_t が最大になった時の値 X_{max} を求め、 X_{max} と試料中の抗原もしくは抗体の量(濃度)との相関から目的の生体成分の濃度を求めることを特徴とする請求項1から請求項8までのいずれか1項に記載の免疫学的測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗原抗体反応を利用して血液や尿中の体液成分などを測定する免疫学的測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】免疫学的測定は、検体中の抗原または抗体と反応する試薬として抗原に対する抗体、抗体に対する抗原を加えて特異的な抗原抗体反応を起こさせ、高い選択性を確保する事ができる。従来、この抗原抗体反応により形成される凝集塊(抗原抗体複合体)を検出する免疫学的測定法として、

1)比濁法(turbidimetric immunoassay):抗原抗体反応による凝集塊を含む溶液に光を照射し、その透過光強度を検出して測定する方法、

2)比ろう法(nephelometric immunoassay):抗原抗体反応の凝集塊を含む溶液に光を照射し、その散乱光強度を検出する方法、

3)ラテックス免疫凝集法(latex agglutination immunoassay):反応試薬としての抗体をポリスチロールなどの固相表面に固定化して、凝集感度を上昇させたもので、検出測定法は比濁法、比ろう法と同じ方法がある。さらに、フローセル中に試料を流し凝集塊の数を計測する方法もある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところが、従来の技術

の比濁法、比ろう法およびラテックス免疫凝集法では多くの凝集塊（抗原抗体複合体）を含む広い領域からの透過光または散乱光の強度を測定しているため、試料中に含まれる乳び、ビリルビン、ヘモグロビン等による光吸収や光多重散乱の影響を受け易く精度の高い測定ができない。

【0004】特に、ラテックス免疫凝集法においては、未凝集のラテックス粒子が散乱体として大きな背景光となる点や、多重散乱光を測定している点で、精度の高い高感度測定ができない。これらの課題を解決する従来技術として、レーザ光を照射したフローセル中に凝集塊を含む試料を流し、凝集塊個々の散乱光強度から凝集塊の大きさとその数を計測する方法がある。

【0005】しかしながら、この方法はフローセル中に試料を流して測定するために、凝集塊の形成を時系列的に測定することができず、凝集反応が終了する時点での1点計測のみがなされている。すなわち、フローセル法では、凝集反応終了後の試料をフローセル中に流し、凝集率と測定対象の生体成分の量との相関から試料中の生体成分の量を測定しており、定量測定に重要なパラメータであるところの、試料に抗体或いは抗原を加えてから凝集塊が発現するまでの時間（遅延時間）や凝集塊が形成されて行く速度を測定することができない。

【0006】また、フローセル中に個々の凝集塊を分離して流すために試料の希釈が必要であり、測定時に凝集塊が解離する可能性があり、精度の高い測定ができない点や、フローセル中に試料を流すために複雑な制御装置が必要で、装置の容量が大きくなる等の欠点がある。

【0007】そこで本発明では、上記のような従来技術の欠点を解消し、凝集塊の大きさと数とを時系列で測定できる免疫学的凝集測定装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明によれば、生体試料中に含まれる抗原もしくは抗体と特異的に反応する抗体もしくは抗原と、或いは、抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子を含む溶液を混合して抗原抗体凝集反応を生じさせることにより、生体試料中の諸成分の量を測定する免疫学的測定装置において、レーザ光源と、レーザ光源からのレーザ光束をコリメートして反応試料セルに照射する手段と、反応試料セル中の抗原及び抗体を含む試料溶液を攪拌することにより、抗原抗体凝集反応を均一に発現させ、且つ、攪拌による流れにより凝集散乱体をレーザ光束中に通過させる手段と、試料セル中の散乱体からの多重散乱光の受光を防ぐ目的で、レーザ光束を試料セル内壁近傍に通過させる手段と、試料セルからの散乱光を受光する受光素子と、受光素子からの信号を評価して抗原抗体反応による凝集塊の粒子径とその数を時系列的に計測する手段と、計測された凝集塊の粒子径とその数を表示する手段とを備えた構成を採用した。

【0009】

【作用】このような構成によれば、抗原抗体反応による粒子（凝集塊）の大きさと数とを時系列的に測定でき、抗原抗体反応によって生ずる凝集塊の粒子の特性を多角的に測定することが可能になるとともに、高感度の抗原抗体凝集反応測定が可能になる。

【0010】好ましい実施例では、試料セル内壁近傍をレーザ光束で照射し、試料溶液を攪拌し、計測手段が、粒子径に対応した上方しきい値と下方しきい値を有し受光素子からの信号を各しきい値と比較して粒子径を識別する複数の比較手段と、各比較手段から信号を計測するカウンタからなり、比較手段の数に対応した粒子径とその数が時系列的に計測される。

【0011】また、受光素子が測定粒子のほぼ1個からの散乱光を受光するように構成され、それにより測定精度を向上させることができる。

【0012】また、複数の受光素子が設けられ、その受光素子に対応した散乱光が同時に測定され、その場合、受光素子の一对からの出力を減算して有効信号の割合を増大させることができ、それにより測定時のS/N比を向上させることができる。

【0013】このような免疫学的凝集測定装置は、従来技術の比濁法および比ろう法による免疫凝集測定装置に比べ遥かに測定感度が高く、微量成分の測定が可能となる。且つ、フローセル法と比べ、凝集塊粒子の大きさと数と時系列的測定が可能のため、抗原抗体反応を観察する上に多くのパラメータを提供することが可能であり、装置は簡素で小型軽量化が可能である。

【0014】

【実施例】以下、図面に示す実施例に基づき、本発明を詳細に説明する。

【0015】図1に、本発明を採用した免疫学的凝集測定装置の構成を示す。図1において、散乱光強度測定のための半導体レーザ光源は、駆動回路9により駆動されてレーザ光を発生する。このレーザ光は、集光レンズ2によってシート光にコリメートされ、抗原および抗体を含む試料ガラスセル内の内壁近傍に照射される。

【0016】試料セル3内の溶液は37℃の一定温度に保たれ、スターラーバー（攪拌棒）4とマグネチックスター5によって1000rpmで回転攪拌される。

【0017】試料溶液中の凝集塊からの散乱光は、受光レンズ6を介して複数の受光素子のフォトダイオード8（8a～8d）によって電気信号として測定される。各々のフォトダイオードの前部に、統計的に凝集塊1個のみが測定できる観察領域からの散乱光を受光するためにピンホール7が配置される。フォトダイオード8の出力は増幅器10により電流電圧変換、増幅後、AD変換器11によりAD変換されてコンピュータ12に入力される。

【0018】AD変換された信号は、図2に示すよう

に、コンピュータにより信号処理される。2個のフォトダイオード8a、8bからの信号は、減算回路13により一方から他方を減算することによりバックグランド信号が相殺され、符号14で示すように凝集塊のみからの散乱光信号が測定される。このバックグランド信号を除去された信号14は絶対値回路15により絶対値化され、符号16のようなバックグランドのないピークのみ信号となる。

【0019】この絶対値化された信号16はそれぞれ複数のウィンドコンパレータ17に入力され、そのレベルが識別される。各コンパレータは凝集塊の粒径に対応したレベル比較を行なうので、コンパレータの各出力は凝集塊の粒径に対応した信号となっている。この信号がそれぞれカウンタ18でカウントされ、その粒径の凝集塊の数が計数される。この計数されたデータは演算回路19に入力され、後述するように凝集塊の粒径とその数を表示するためのデータ演算を行なう。なお、コンパレータ、カウンタ、演算回路は、図1のコンピュータ12により実装することができる。

【0020】また、図3では、フォトダイオード8a、8bの出力信号の処理を説明したが、他のフォトダイオード8c、8dについても同様な処理が行われる。このような一対の受光素子の凝集塊の計測確率を高めるために複数組の受光素子が用いられる。

【0021】図1のコンピュータにより凝集塊の粒径とその数を計数するとともに、式

【0022】

【数2】

$$X_t = \sum_{k=2}^n (\omega_k P_k)$$

【0023】(ただし、Kは凝集数、 ω_k はk個の凝集塊に付加する重み係数、 P_k は凝集数kの粒子数、nは2以上の任意の整数)から時間t当たりの凝集塊粒子数 X_t を求める演算を行ない、不図示のディスプレイにより結果を表示する。

【0024】次に試料液中の測定対象成分と特異的に結合する抗体もしくは抗原、あるいは抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子を試料液中に添加した時点から一定以上の凝集塊粒子数 X_t が計測されるまでの時間TL(遅延時間)と、このTLと試料中の測定対象成分である抗体もしくは抗原の量(濃度)との相関より目的の成分の濃度をコンピュータ12により演算し、表示する。

【0025】さらに、試料液中の測定対象成分と特異的に結合する抗体もしくは抗原、あるいは抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子とを混合して生ずる凝集塊粒子の生成速度 V ($V = dX_t / dt$)の最大値 V_{max} と、 V_{max} と試料液中の測定対象成分である抗体もしくは抗原の量(濃度)との相関より目的の成分の濃度をコンピュータ12により演算し、表示する。

【0026】次に、試料液中の測定対象成分と特異的に結合する抗体もしくは抗原、あるいは抗体もしくは抗原を付けたラテックス粒子とを混合して生ずる凝集塊粒子の数 X_t が最大になった時の値 X_{max} と、 X_{max} と試料液中抗体もしくは抗原の量(濃度)との相関により目的の成分の濃度をコンピュータ12により演算し、表示する。

【0027】図3に本発明を採用した測定装置によってイミューグロブリンG(IgG)を測定した実施例を示す。

【0028】同図の(A)には1.2mg/lのIgGを含む血清の測定結果を、(B)には0.25mg/lのIgGを含む血清の測定結果を、(C)には0.013mg/lのIgGを含む血清の測定結果を、(D)には0.06mg/lのIgGを含む血清の測定結果を、(E)には0.03mg/lのIgGを含む血清の測定結果を示してある。

【0029】以上の測定においては、IgGを含む血清を反応試料セルに入れ、続いてIgGの抗体を添加して測定を開始する。図3に示すように、本発明を採用した測定装置では、コンパレータ17により粒径がそれぞれ凝集塊粒度として識別され、各カウンタによりカウントされた粒度の数が凝集塊数として時系列的に時間経過にしたがって表示されている。ディスプレイでの表示は、図示のようなグラフ形式により行なうことが考えられる。

【0030】本発明を採用した測定装置では、0.01mg/lの極めて低濃度のIgGを含む血清での測定が可能であり、従来技術の比濁法、比ろう法に比べ約100倍の高感度測定ができる。

【0031】図4に、上記のIgG測定において演算、表示された凝集塊総粒子数 X_t 、凝集生成速度 V_t 、遅延時間TL、最大凝集生成速度 V_{max} と最大凝集総粒子数 X_{max} を示す。同図(A)は、0.25mg/lのIgGを、(B)は、0.12mg/lのIgGを、(C)は、0.06mg/lのIgGを、(D)は、0.03mg/lのIgGをそれぞれ測定した際の X_t および V_t の変化を示している。

【0032】また、図5の(A)は、遅延時間の逆数 $1/TL$ とIgG濃度との相関を、(B)は最大凝集生成速度 V_{max} とIgG濃度との相関を、(C)は最大凝集総粒子数 X_{max} のそれぞれとIgG濃度との相関を示す。

【0033】図5の(A)より明らかなように、遅延時間TLの逆数 $1/TL$ とIgG濃度とは1次の相関を示し、式

$$TL = k / [IgG]$$

(ただし、kは正の定数、[IgG]はIgGの濃度)により示される。

【0034】また、図5の(B)より明らかなように、

最大凝集生成速度 V_{max} と $I_g G$ 濃度は、式

【0035】

【数3】

$$V_{max} = V \frac{k[I_g G]}{1 - k[I_g G]}$$

【0036】 (ただし、 V および k は正の定数) により示される。

【0037】 また、図5の(C)より明らかなように、最大凝集総粒子数 X_{max} のそれぞれと $I_g G$ 濃度は、式 10

$$X_{max} = k \cdot \log [I_g G]$$

(ただし、 k は正の定数) により示される。

【0038】 以上の式のいずれかを用いて、コンピュータで演算を行なうことにより、測定される TL 、 V_{max} 、もしくは X_{max} より血清中の $I_g G$ の濃度を算出することができる。

【0039】

【発明の効果】 以上から明らかなように、本発明によれば、レーザ光源からのレーザ光束がコリメートして試料セルに照射され、粒子の大きさとその数が時系列的に表示されるので、抗原抗体凝集反応を測定する場合、高感度に、且つ、時間経過に応じて生じる凝集塊の大きさと数とを時系列で測定することができ、医療分野において血液や尿など生体成分の分析に有用な免疫学的測定装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による免疫学的測定装置の全体構成を示

す構成図である。

【図2】 図1の受光素子から得られる散乱強度の変化を示す波形図である。

【図3】 信号処理の詳細な構成を示すブロック図である。

【図4】 本発明装置による免疫凝集反応測定データを表示した説明図である。

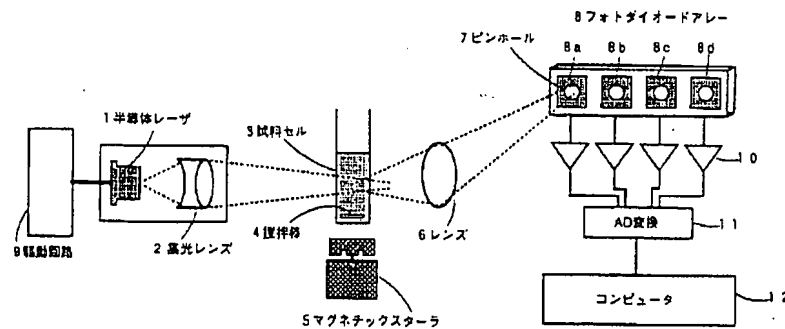
【図5】 本発明装置による免疫凝集反応測定データを表示した説明図である。

【符号の説明】

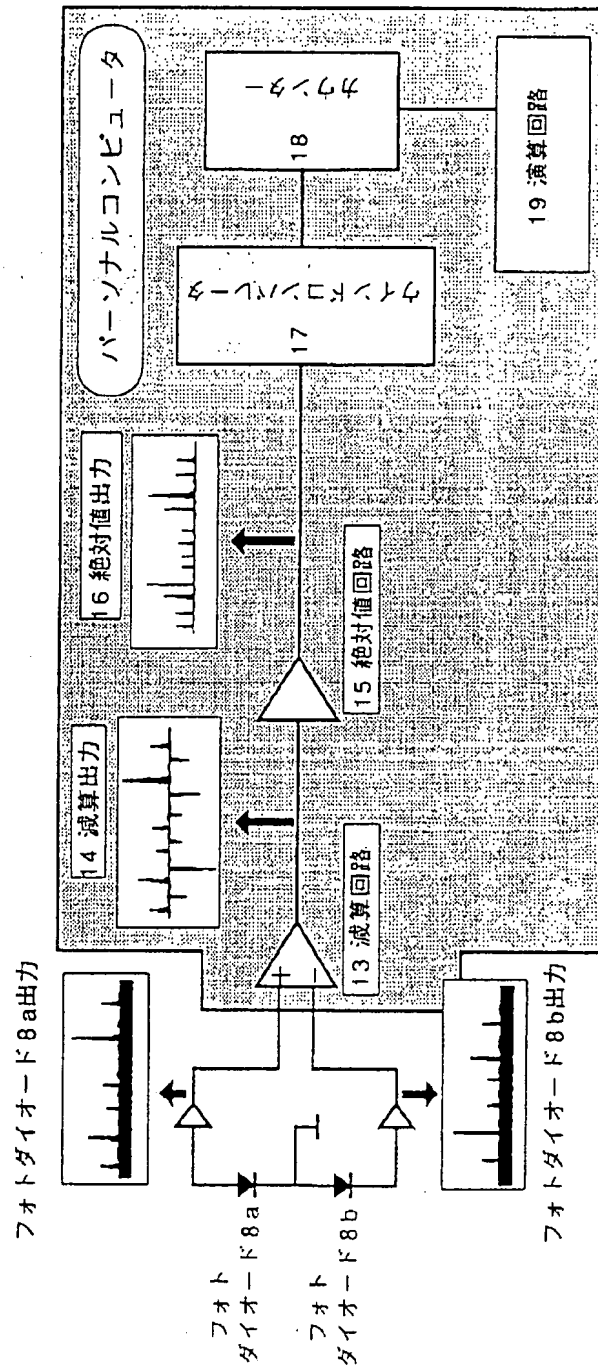
- 1 半導体レーザ
- 2 集光レンズ
- 3 試料セル
- 4 スターラバー (攪拌棒)
- 5 マグネチックスターラ
- 6 受光レンズ
- 7 ピンホール
- 8 フォトダイオード
- 9 駆動回路
- 10 増幅器
- 11 AD変換器
- 12 コンピュータ
- 13 減算回路
- 17 ウィンドコンパレータ
- 18 カウンタ
- 19 演算回路

【図1】

(図 1)

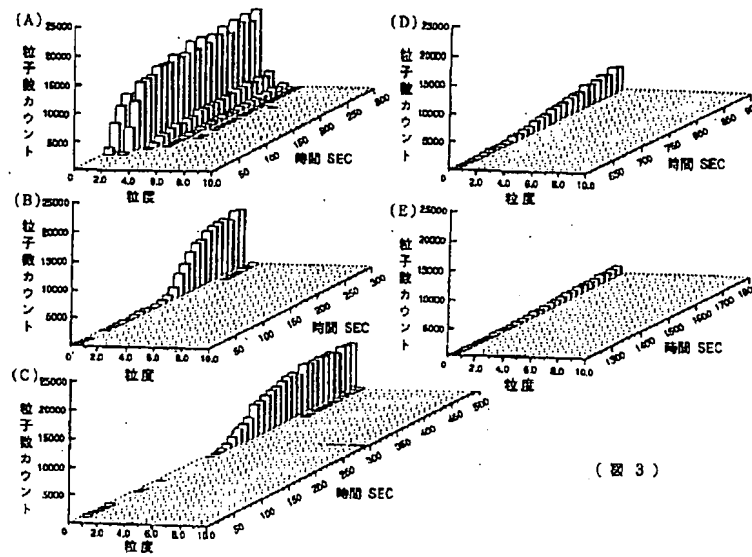


【図2】



(図 2)

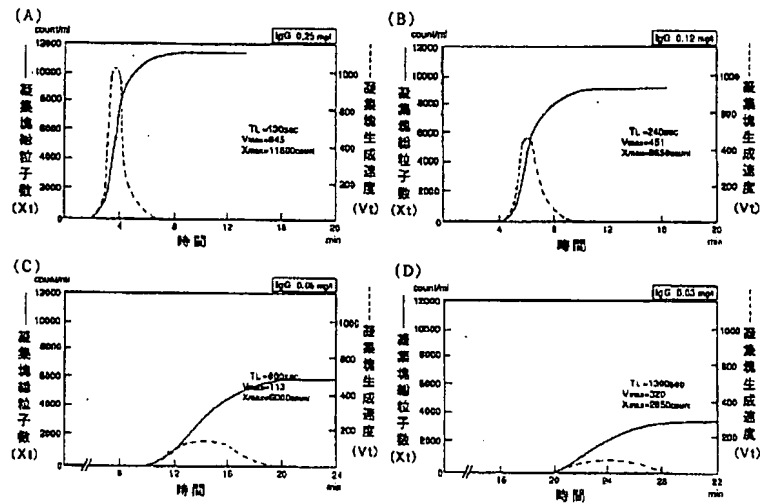
【図3】



(図3)

【図4】

(図4)



【図5】

(図 5)

